

# テトラヒドロクルクミンの水溶液中における物性評価とその応用可能性の検討

著者	佐藤 きよ子
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/48861">http://hdl.handle.net/10097/48861</a>

## 第 4 章 テトラヒドロクルクミンの水系における

### 鉄 (III) 還元効果

#### 4.1 緒 言

前章の 3.3.5 でサイクリックボルタンメトリーを測定し、設定条件ではテトラヒドロクルクミンの方がクルクミンより低い酸化還元電位を与えるという新しい事実を見い出した。これはテトラヒドロクルクミンの方がクルクミンより酸化されやすい(相手を還元し易い)ことを示唆するものである。そこでこの章では酸化還元過程が目視並びに紫外吸収スペクトルで確認しやすい *O*・フェナントロリン法で実験を行なうこととした。*O*・フェナントロリン・鉄 (II) 錯体の生成量をモニターしながら クルクミンと比較しつつ測定を試みた。

#### 4.2 実 験

##### 4.2.1 装置

吸収スペクトルは日立製の分光光度計 HITACHI U-2000A Spectrophotometer に光路幅 1 cm の石英セルを用いて測定した。pH メーターは 2.2.1 に示したものと同一のものを用いて測定し、25℃ で pH 4.01, 6.86, 9.18 の標準溶液を用いて校正した。試料及びセル室は、ヤマト製恒温槽 Low Consatnt Water Bath BQ100 を用いて 25℃ とした。

##### 4.2.2 試薬

クルクミンは和光純薬製 (試薬特級) を用いた。 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , (関東化学, 特級),  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (モール塩) (関東化学, 特級), 1, 10・フェナントロリン一水和物 (*O*・フェナントロリン) (関東化学, 特級),  $\text{HCl}$  (関東化学, 特級),  $\text{NaOH}$  (関東化学, 特級), 2・Amino・2・hydroxymethyl・1, 3・propanediol (Tris・buffer) (関東化学, 特級), Nitritotriacetic acid (NTA) (関東化学, 特級), アルゴンガス (東北酸素)



テトラヒドロクルクミンの濃度は  $2.70 \times 10^{-5} \text{ M} \sim 4.32 \times 10^{-4} \text{ M}$  の範囲で測定した. 以下に  $2.70 \times 10^{-5} \text{ M}$  の場合の例を示す.

NTA 溶液 (  $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  ) 0.02 ml, 塩化第二鉄溶液 0.02 ml (  $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ , 12 N · HCl 5 ml / l ), Tris - buffer 1.457 ml ( pH 7.40 ), テトラヒドロクルクミン溶液 0.003 ml (  $5.92 \times 10^{-3} \text{ M}$  ), *O* - フェナントロリン溶液 0.5 ml (  $5 \times 10^{-3}$  M ) の順に試薬をセルに加え, 測定試料とした.

波長 510 nm, 1 分間隔で 3 時間吸光度変化を測定した ( Fig. 4 - 1 ).

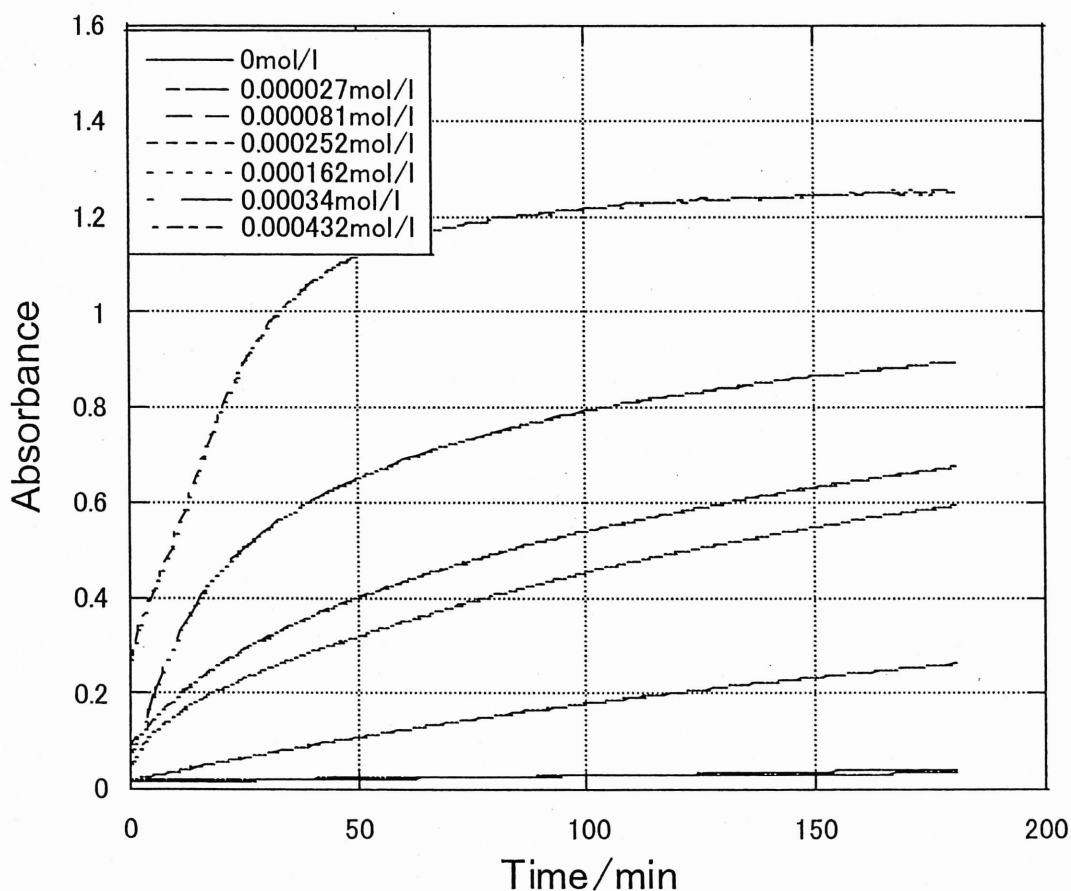


Fig. 4 - 1 Reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$  by tetrahydrocurcumin at various concentration measured as increase in absorbance of phenanthroline complex at 510 nm



テトラヒドロクルクミンの濃度が高いほど*O*-フェナントロリン-鉄(II)錯体の生成量が短時間に増加していることがわかる。

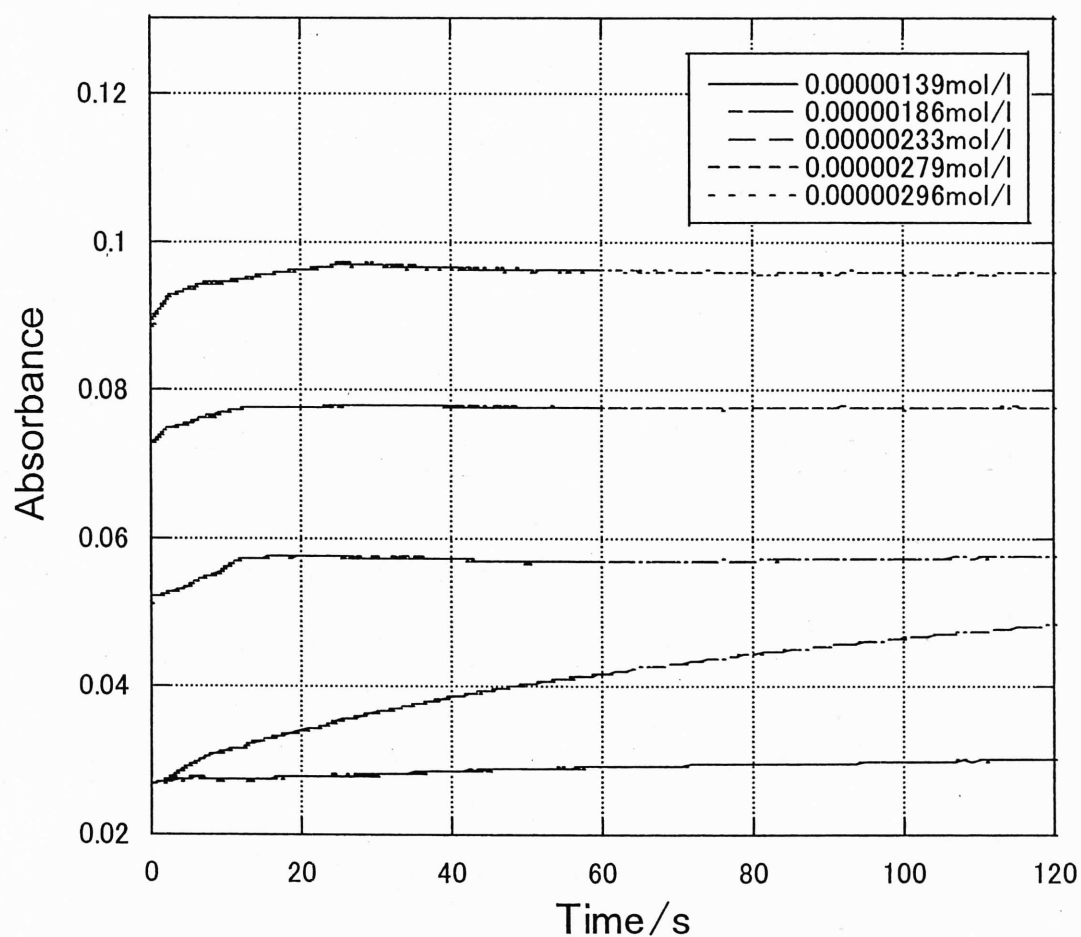


Fig. 4 - 2 Reduction of  $\text{Fe}^{3+}$  to  $\text{Fe}^{2+}$  by curcumin at various concentration measured as increase in absorbance of phenanthroline complex at 510 nm

一方、クルクミンは DMSO に溶解し、遮光下で貯蔵した。クルクミンの濃度は  $1.399 \times 10^{-6} \text{ M} \sim 2.962 \times 10^{-6} \text{ M}$  の範囲で測定した。以下に  $1.399 \times 10^{-6} \text{ M}$  の場合の例を示す。

セルに NTA 溶液 ( $1 \times 10^{-2} \text{ M}$ ) 0.02 ml, 塩化第二鉄溶液 0.02 ml ( $1.0 \times 10^{-2} \text{ M}$ , 12 N · HCl 5 ml / l), Tris · buffer 1.457 ml (pH 7.40) の順にいれ, 溶存酸素による自動酸化防止の為, アルゴンを 15 分間通気した。続いてクルクミン溶液 0.003 ml ( $9.328 \times 10^{-4} \text{ M}$ ), *O* · フェナントロリン溶液 0.5 ml ( $5 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) をセルに加え, 測定試料とした。

波長 510 nm, 0.1 秒間隔で 10 分間吸光度変化を測定した (Fig. 4 · 2)。

クルクミンの濃度が高いほど *O* · フェナントロリン · 鉄 (II) 錯体の生成量が多いが, テトラヒドロクルクミンより極短時間に生成し, カーブは一定となる。これはクルクミンが中性付近の pH で短時間に分解されやすく<sup>1)</sup>, クルクミン以外の Fig. 4 · 3 に示すような物質に変化<sup>2)</sup> するからだと思われる。

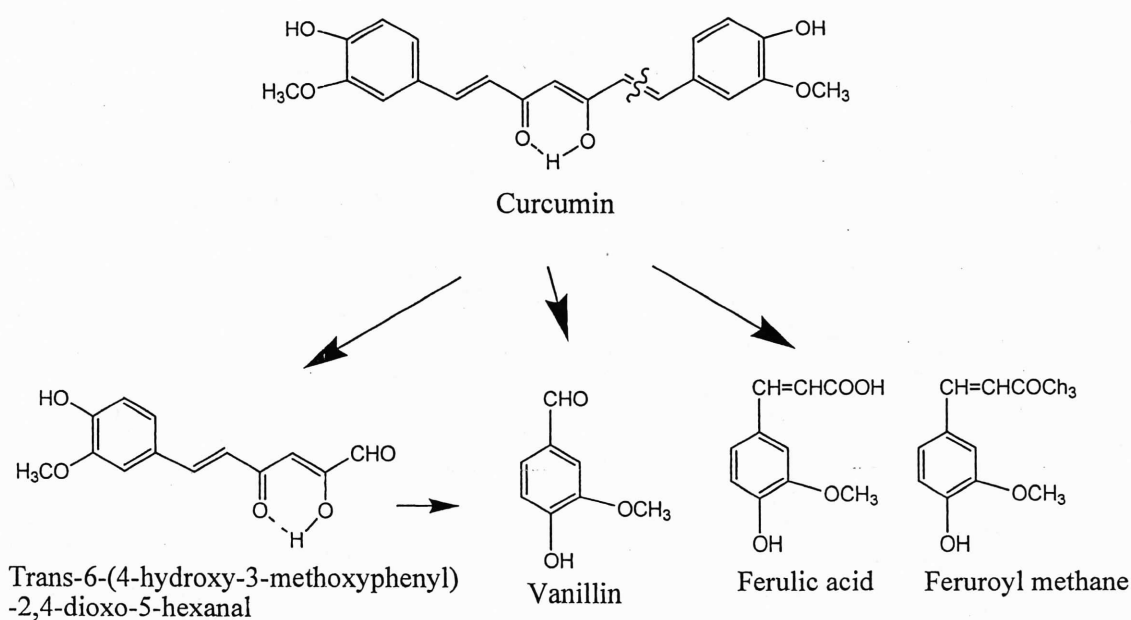


Fig. 4 · 3 Degradation products of curcumin

#### 4.2.5 $k_{\text{obs}}$ の算出

##### 4.2.5.1 テトラヒドロクルクミン:

テトラヒドロクルクミン自体は無色であり、測定波長である 510 nm 付近に吸収はないものの、測定試料溶液にテトラヒドロクルクミンが含まれていない場合でも、時間が経過すると吸光度がわずかに上昇する。そこで各濃度における吸光度は、テトラヒドロクルクミンを含まない場合 (0 mol/l) の吸光度を差し引いたものとし、その値で計算を行った (Fig. 4・1)。式 (1) より生成速度定数  $k_{\text{obs}}$  を求めた。ここで  $A_t$ ,  $A_{\infty}$  はそれぞれ時間  $t$  , 及び無限大における吸光度を示す。

$$\frac{A_{\infty} - A_t}{A_{\infty} - A_0} = \exp(-k_{\text{obs}} t) \quad (1)$$

求めた  $k_{\text{obs}}$  を Fig. 4・4 及び Table 4・1 に示す。

##### 4.2.5.2 クルクミン:

クルクミンは pH 7.4 の場合、510 nm 近辺でも僅かな吸収が認められる<sup>5)</sup>。そこで各濃度における吸光度はそれぞれの濃度のクルクミンと緩衝溶液のみの吸光度を引いたものとし (Fig. 4・2), その値を計算に使用して, (1) 式より求めた。得られた  $k_{\text{obs}}$  を Fig. 4・5, 及び Table 4・1 に示す。

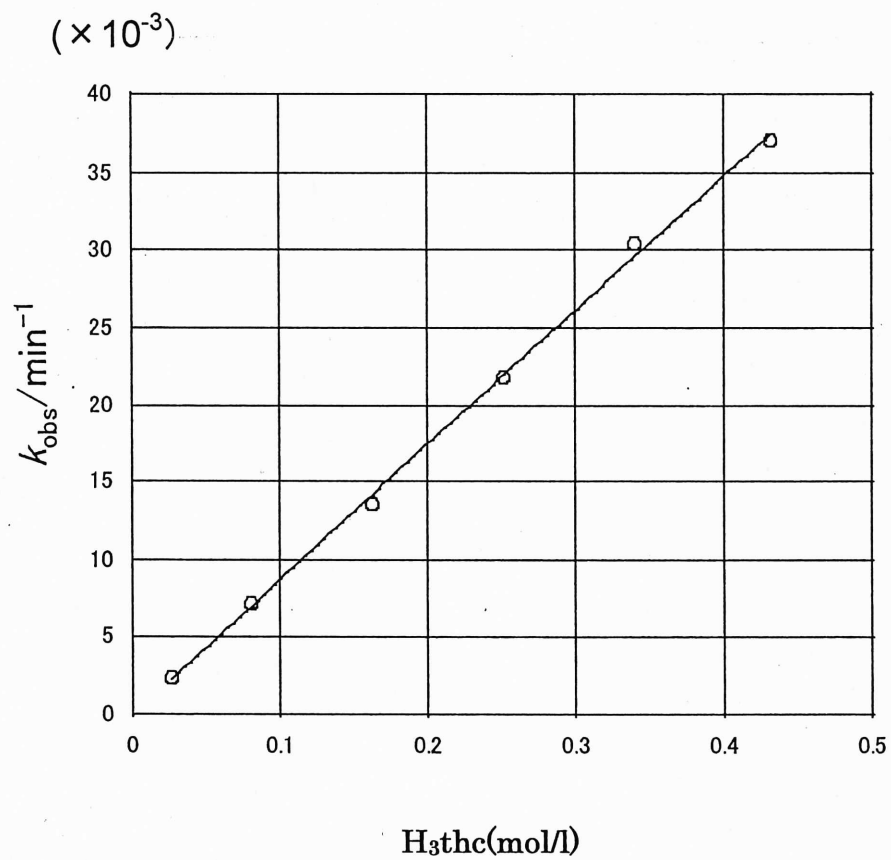


Fig. 4 - 4 Formation rate constants of tetrahydrocurcumin phenanthroline complex at various concentration

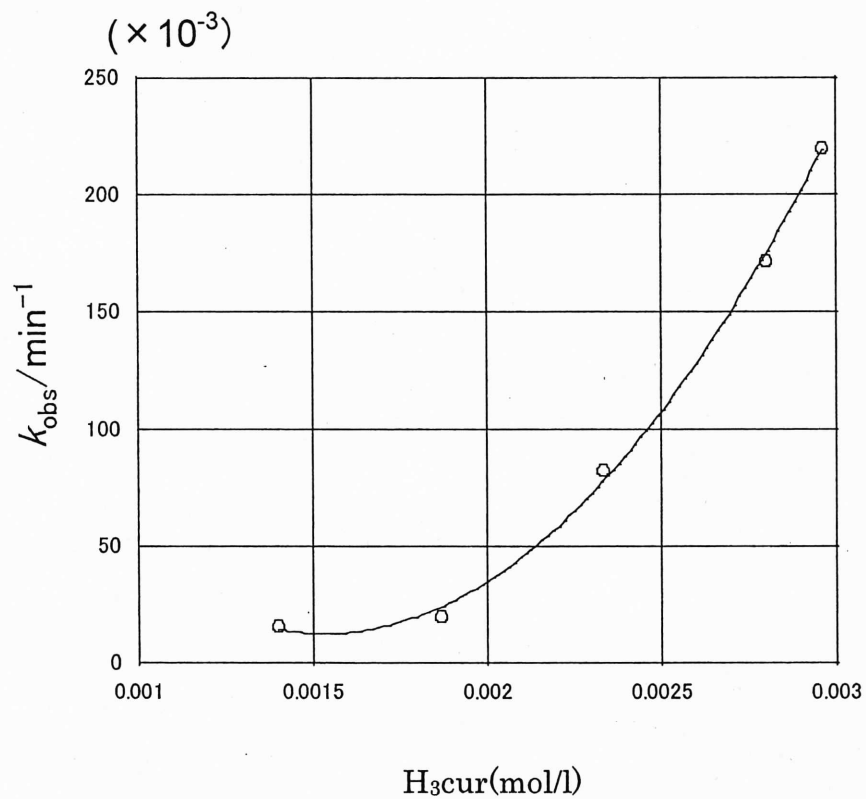


Fig. 4 - 5 Formation rate constants of curcumin phenanthroline complex at various concentration

Table 4 - 1 Formation rate constants of phenanthroline complex at 510 nm

	mol/l	$k_{\text{obs}}/\text{min}^{-1}$	temp./ °C
H <sub>3</sub> thc	$2.70 \times 10^{-5}$	$2.4 \times 10^{-3}$	25°C
	$8.10 \times 10^{-5}$	$7.2 \times 10^{-3}$	25°C
	$1.62 \times 10^{-5}$	$13.6 \times 10^{-3}$	25°C
	$2.52 \times 10^{-4}$	$21.8 \times 10^{-3}$	25°C
	$3.40 \times 10^{-4}$	$30.4 \times 10^{-3}$	25°C
	$4.32 \times 10^{-4}$	$37.1 \times 10^{-3}$	25°C
H <sub>3</sub> cur	$1.39 \times 10^{-6}$	$15.6 \times 10^{-3}$	25°C
	$1.86 \times 10^{-6}$	$19.8 \times 10^{-3}$	25°C
	$2.33 \times 10^{-6}$	$82.0 \times 10^{-3}$	25°C
	$2.79 \times 10^{-6}$	$172.1 \times 10^{-3}$	25°C
	$2.96 \times 10^{-6}$	$220.2 \times 10^{-3}$	25°C

### 4.3 結果と考察

実験の結果得られたテトラヒドロクルクミンの *O*・フェナントロリン・鉄 (II) 錯体の各濃度における生成速度定数  $k_{\text{obs}}$  は原点を通る直線 (Fig. 4-4) であり, 生成した錯体の量はテトラヒドロクルクミンの濃度に依存することが裏付けられる. これはテトラヒドロクルクミンが pH に依存することなく長時間空気酸化に対して安定<sup>1)</sup>である為と思われる.

それに比べ, クルクミンの場合は中性付近の pH においては速やかに分解

することがわかっており<sup>1)</sup>、生体内における pH に近い条件として設定した pH 7.4 では 分解速度が速く、実験は困難であった。また、クルクミンの中性付近における水に対する溶解度が極めて低いため、濃度は  $1.399 \times 10^{-6} \text{ M}$  ～  $2.962 \times 10^{-6} \text{ M}$  の範囲で測定せざるを得なかった。実験の結果得られた O・フェナントロリン・鉄(II) 錯体の各濃度における生成定数  $k_{\text{obs}}$  はテトラヒドロクルクミンのように濃度に依存し、濃度が高くなると増大するとはいえるものの、原点を通る直線とは言えなかった。今回の実験により、クルクミンが中性付近の pH で速やかに分解するのに比べ、テトラヒドロクルクミンは安定して  $\text{Fe}^{3+}$  を  $\text{Fe}^{2+}$  に還元することが証明された。この観点から言えばテトラヒドロクルクミンは pH に依存せず還元性を有すると言え、これは数あるクルクミノイドの中にあってもテトラヒドロクルクミンの特筆すべき特徴であると言える。

この O・フェナントロリン・鉄(II) 錯体の生成量からクルクミンの還元能力を評価する実験を kunchandy<sup>3)</sup> らも本実験よりかなり濃いクルクミン濃度 (20 mM) で行っている。また、本研究で使用した NTA ではなく EDTA を使用して実施し、吸光度 (510 nm で測定) は5分まで増大し、反応は 10 分でほぼ完結すると報告している。しかし、クルクミンを溶解するのに水酸化ナトリウム溶液を使用しているので本実験結果と単純に比較することはできない

#### 4.4 結 言

生体内条件である水系、pH 7.4 におけるテトラヒドロクルクミンの鉄(III) ～ 鉄(II) への還元能力を、O・フェナントロリン・鉄(II) 錯体の生成量より測定し、生成速度定数  $k_{\text{obs}}$  を今回の実験で始めて求めることが出来た。錯体の生成量はテトラヒドロクルクミンの濃度が増加するにつれて増え、原点を通る直線が得られた。クルクミンの場合は pH 7.4 における分解速度が速く錯体の生成量はクルクミンの濃度が濃くなれば増加するという傾向はつかめたものの、テトラヒドロクルクミンのような明確な結果は得られなかった。しかし、クルクミンが生体内でテトラヒドロクルクミンに還元された後、抗酸化過程に寄与する可能性高いと指摘<sup>4), 5), 6)</sup> されている。これらの報告例を考えると *in vivo*

と *in vitro* とでは反応環境が異なっており、クルクミンは *in vivo* では生体に取り込まれた後、ただちにテトラヒドロクルクミンに変換されるシステムが介在され、今回の実験結果とは異なる挙動をしている可能性が推定される。

クルクミノイドの抗酸化システム解明に当たっては、今後、より生体内条件に近い環境でのテトラヒドロクルクミン及びクルクミンの挙動調査が必要と考える。



## 参 考 文 献 ( 第 4 章 )

- 1) 佐藤きよ子, 壹岐伸彦, 高橋 透, 星野 仁: 分析化学 ( Bunseki Kagaku ), 57, 257, (2008).
- 2) Y. - J. Wang, M. - H. Pan, A. - L. Cheng, L. - I. Lin, Y. - S. Ho, C. - Y. Hsieh, J. - K. Lin : J. Pharm. Biomed. Anal., 15, 1867 (1997) .
- 3) E. kunchandy, M. N. A. Rao: *Int. J. Pharm.*, 57, 173 (1989).
- 4) H. H. TØnnesen, J.V Greenhill: *Int. J. Pharm.*, 87, 79 (1992).
- 5) G. M. Holder, J. L. Pulummer, A. J. Ryan: *Xenobiotica*, 8, 761 (1978)
- 6) T. Osawa, Y. Sugiyama, M. Inayoshi, S. Kawakishi: *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 1609 (1995).

## 第5章 テトラヒドロクルクミン/水酸アパタイト複合体の創製と 応用可能性の検討

### 5.1 緒 言

先の章において、テトラヒドロクルクミンが水溶液中において安定性が高いこと、およびテトラヒドロクルクミンが酸化剤にも還元剤にもなり、生体の恒常性を保つ機能に優れている可能性を示した。これまでに、クルクミンの還元体であるテトラヒドロクルクミンにもクルクミン以上の活性能力があることが明らかにされており<sup>1)</sup>、また、実際に生体内で活性を示すのはテトラヒドロクルクミンの方ではないかという報告もある。そこで、この章では、高いテトラヒドロクルクミンの薬理効果の利用の可能性を検討することを目的とした。

高齢者人口が急激に増加しているわが国においては、骨粗鬆症などの骨の疾患が増えている。特に女性は加齢により卵巣が衰え、卵巣ホルモンが不足し、骨粗鬆症を起こしやすくなる。ホルモンのバランスが崩れるとエストロゲン不足により破骨細胞が働き過ぎ、必要以上に破骨と再吸収が行われ、骨の形成、代謝システムに不都合が生じる。もし、クルクミンが骨の代謝システム（造骨と破骨）を制御する能力を有すれば、テトラヒドロクルクミンは更に強力な骨代謝システム制御力を秘めていると考えられ、有力な骨粗鬆症や骨折などの骨疾患の修復剤となりうる。

薬剤を有効利用する手法として、ドラッグデリバリーシステム（DDS）が考えられる。DDSとは、適切な量の薬剤を適切な場所に適切な期間にわたって投与することにより、薬剤の効能を効率的に利用できるシステムである<sup>2)</sup>。このDDSにおいては、薬剤を担持する担体が非常に重要な役割を果たす。本研究では、骨部位での利用を考え、水酸アパタイト（ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HA）を担体として選択した。HAは、リン酸カルシウム的一种で骨や歯の主成分である<sup>3)</sup>。HAセラミックスは生体組織に対して高い親和性を示すことから、骨修復材料として用いられている<sup>3)</sup>。さらに、タンパク質等の有機化合物に対して吸着特性を示す<sup>4)</sup>ことから、吸着剤やクロマトグラフィーカラム充填剤としても利用されている<sup>5)</sup>。吸着能力も高く、生体親和性も高いことから、薬剤の担体として広く研究

されている<sup>6,7)</sup>。その中で、井奥らは水熱法を利用し、カルシウム欠損組成の HA 柱状粒子から構成される多孔体の作製に成功した<sup>8,9)</sup>。作製した HA 多孔体は、タンパク質の種類に対して選択的な吸着特性を示す<sup>10)</sup>とともに、骨欠損部に埋入すると、骨代謝に取り込まれて骨再生を促進することを明らかにした<sup>11)</sup>。したがって、このカルシウム欠損組成の HA 柱状粒子から構成される多孔体にテトラヒドロクルクミンを担持し、これにより骨代謝に与える影響や、骨腫瘍に対する効果を明らかにできれば、テトラヒドロクルクミンの薬理効果の利用の可能性が期待できる。

そこで本研究では、まずテトラヒドロクルクミンが、骨芽細胞様細胞や骨肉腫細胞に与える影響について調べた。次に、HA へのテトラヒドロクルクミンの担持を目指して、HA 顆粒の作製とそのテトラヒドロクルクミン吸着特性を調べた。最後に、テトラヒドロクルクミンを担持した HA が細胞に与える影響について検討した。

## 5.2 実 験

### 5.2.1 テトラヒドロクルクミンが細胞に与える影響の検討

#### 5.2.1.1 テトラヒドロクルクミンの合成

2 章での方法で報告した方法に倣い、テトラヒドロクルクミンを合成した。合成したテトラヒドロクルクミンに純水を加え、飽和テトラヒドロクルクミン水溶液を調製した。

#### 5.2.1.2 骨芽細胞様細胞に与える影響

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。細胞の培養には、10 % のウシ胎児血清（FBS, GIBCO 製）を含む  $\alpha$ -MEM（Alpha Minumun Essential Medium, GIBCO 製）を培地として用いた。この培地中であらかじめ細胞を培養しておいた。

以下の3種類の培地を用意し、いずれも混合後、0.22  $\mu$ m フィルターで滅菌した。

- ① 培地  $10\text{ cm}^3$  + 飽和テトラヒドロクロクミン水溶液  $1.25\text{ cm}^3$  (テトラヒドロクロクミン添加培地)
- ② 培地  $10\text{ cm}^3$  + 純水  $1.25\text{ cm}^3$  (水添加培地)
- ③ 培地のみ (無添加培地)

予め通常の培地  $5\text{ ml}$  中で培養しておき、それを用いて単離細胞が  $1 \times 10^5$  個/ $\text{cm}^3$  となる通常の培地を用意した。24 穴プレートに、1 つのウェルにつき、先に用意した培地を  $0.9\text{ cm}^3$  および  $1 \times 10^5$  個/ $\text{cm}^3$  を含む培地  $0.1\text{ cm}^3$  を入れ混合した。テトラヒドロクロクミン添加培地においては、テトラヒドロクロクミンの飽和溶液が 10 % 含まれることになり、細胞数は 1 ウェルあたり  $1 \times 10^4$  個とした。このプレートを  $37^\circ\text{C}$ 、5 %  $\text{CO}_2$  雰囲気インキュベータ中で、3 日間培養した。培養後、0.25 % トリプシン - EDTA 溶液を加えて細胞をはがし、血球計数盤を用いて細胞数をカウントした。

#### 5.2.1.3 骨肉腫細胞に与える影響

ヒト骨肉腫細胞 HOS を、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。細胞の培養には、10 % のウシ胎児血清 (FBS, GIBCO 製) と 0.1 mM NEAA (Non-Essential Amino Acids, GIBCO 製) を含む MEM (Minimum Essential Medium, GIBCO 製) を培地として用いた。この培地中であらかじめ細胞を培養しておいた。

以下の 3 種類の培地を用意し、いずれも混合後、 $0.22\text{ }\mu\text{m}$  フィルターで滅菌した。

- ① 培地  $10\text{ cm}^3$  + 飽和テトラヒドロクロクミン水溶液  $1.25\text{ cm}^3$  (テトラヒドロクロクミン添加培地)
- ② 培地  $10\text{ cm}^3$  + 純水  $1.25\text{ cm}^3$  (水添加培地)
- ③ 培地のみ (無添加培地)

予め通常の培地  $5\text{ cm}^3$  中で培養しておき、それを用いて単離細胞が  $1 \times 10^5$  個/ $\text{cm}^3$  となる通常の培地を用意した。24 穴プレートに、1 つのウェルにつき、先に用意した培地を  $0.9\text{ cm}^3$  および  $1 \times 10^5$  個/ $\text{cm}^3$  を含む培地  $0.1\text{ cm}^3$  を入れ混合した。テトラヒドロクロクミン添加培地においては、テトラヒドロクロクミンの飽和溶液が 10 % 含まれることになり、細胞数は 1 ウェルあたり  $1 \times 10^4$

個とした. このプレートを 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 雰囲気インキュベータ中で, 3 日間培養した. 培養後トリプシン - EDTA 溶液を加えて細胞をはがし, 血球計数盤により細胞数をカウントした ( Fig. 5 - 1).

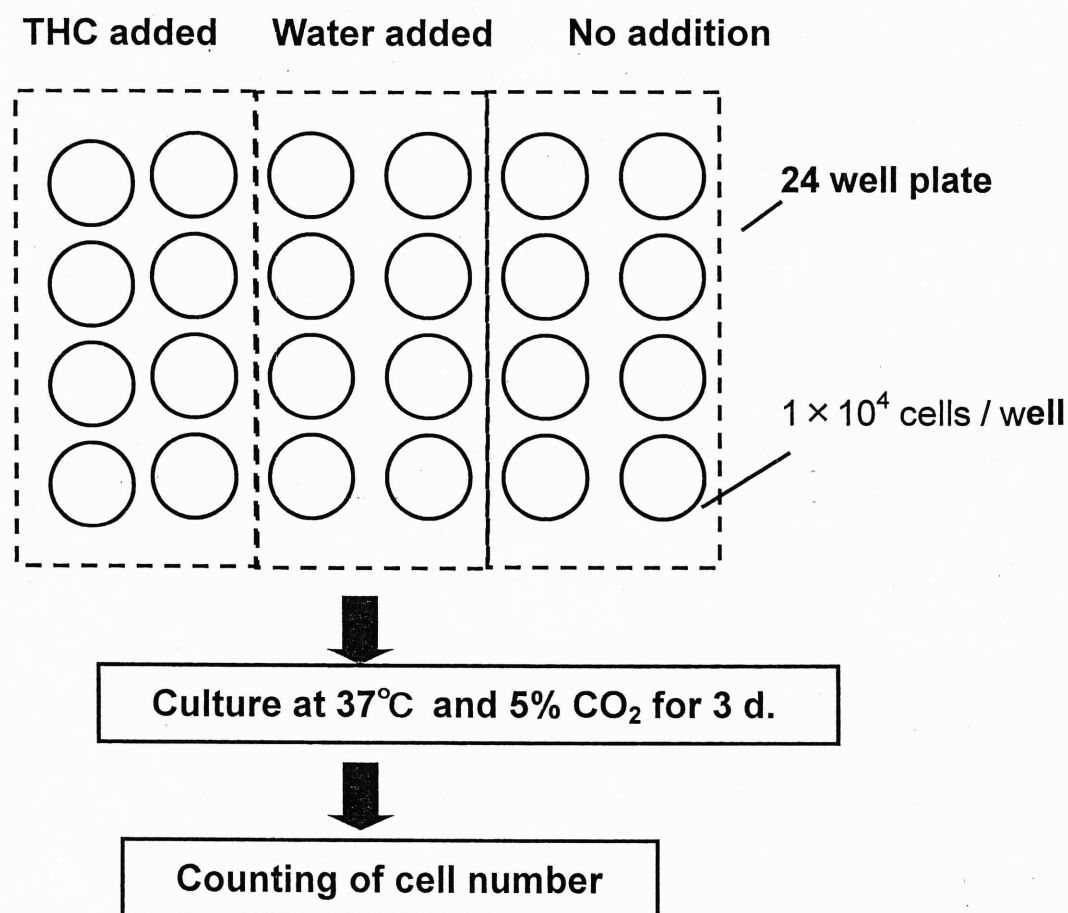


Fig. 5 - 1    Experimental procedure of cell culture.

## 5.2.2    HA 球状顆粒の作製とテトラヒドロクルクミン吸着特性の評価

### 5.2.2.1    HA 球状顆粒の作製

$\alpha$  型リン酸三カルシウム (  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\alpha$ -TCP 大平化学産業株式会社 ) 粉末

13.5 g を, 10 mass % ゼラチン水溶液 67.5 g に加えて混合し, スラリーとした, このスラリーを 5 dm<sup>3</sup> ビーカーの中で 80 °C, 180 ~ 200 rpm の条件下で攪拌している植物油 1.8 dm<sup>3</sup> 中に滴下, 分散させた. 植物油中で 10 min 攪拌後,  $\alpha$  - TCP とゼラチンを含むスラリーを固化させるために, 氷水でビーカーの外周から約 1 h 冷却した. スラリーが固化しているのを確認後, その試料を吸引ろ過で植物油と分離, 回収し, 試料に付着した植物油をエタノールで洗浄した. その後, ゼラチンが溶けないように 4 °C で 24 h 乾燥を行い,  $\alpha$  - TCP とゼラチンからなる顆粒を得た. この顆粒のゼラチンを除去するために  $\alpha$  - TCP の安定領域である 1200 °C で 30 min 大気中で加熱した. 得られた顆粒をふるい分けし, 粒径 が 850 ~ 1180  $\mu$ m のものだけ回収した.

得られた  $\alpha$  - TCP 顆粒 1.0 g を内容積 85 cm<sup>3</sup> の耐圧容器内 ( Fig. 5-2, Fig. 5-3 ) で pH 11 に調整した NH<sub>3</sub> 水溶液 26 cm<sup>3</sup> に浸漬し, 120 °C, 24 h, 飽和水蒸気圧下の水熱条件下に静置した. 耐圧容器から試料を取り出した後, 試料表面に付着した水熱処理溶液を洗浄するため, 試料を蒸留水で 2 回すすぎ, さらに 37 °C で 12 h 蒸留水に浸漬した. なお洗浄液の pH が 7.0 ~ 6.0 の範囲に収まっていることを確認し, 表面に吸着した水熱処理溶液を十分に洗浄できたものと判断した (Fig. 5 - 4).

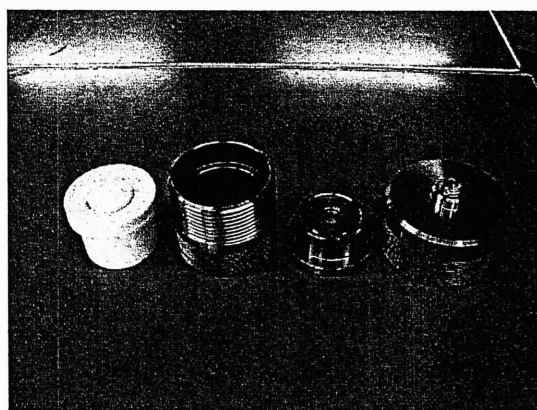


Fig. 5 - 2 Inner structure in the sealed vessel.

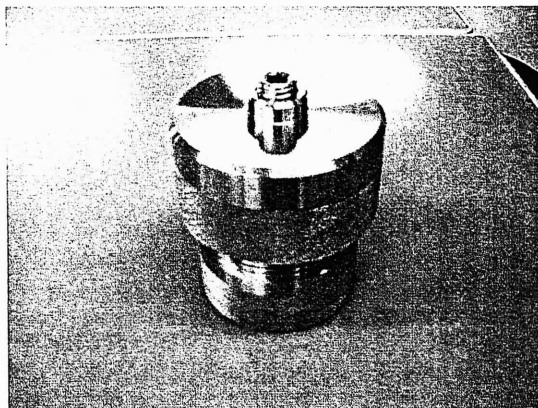


Fig. 5 - 3 Appearance of the sealed vessel.

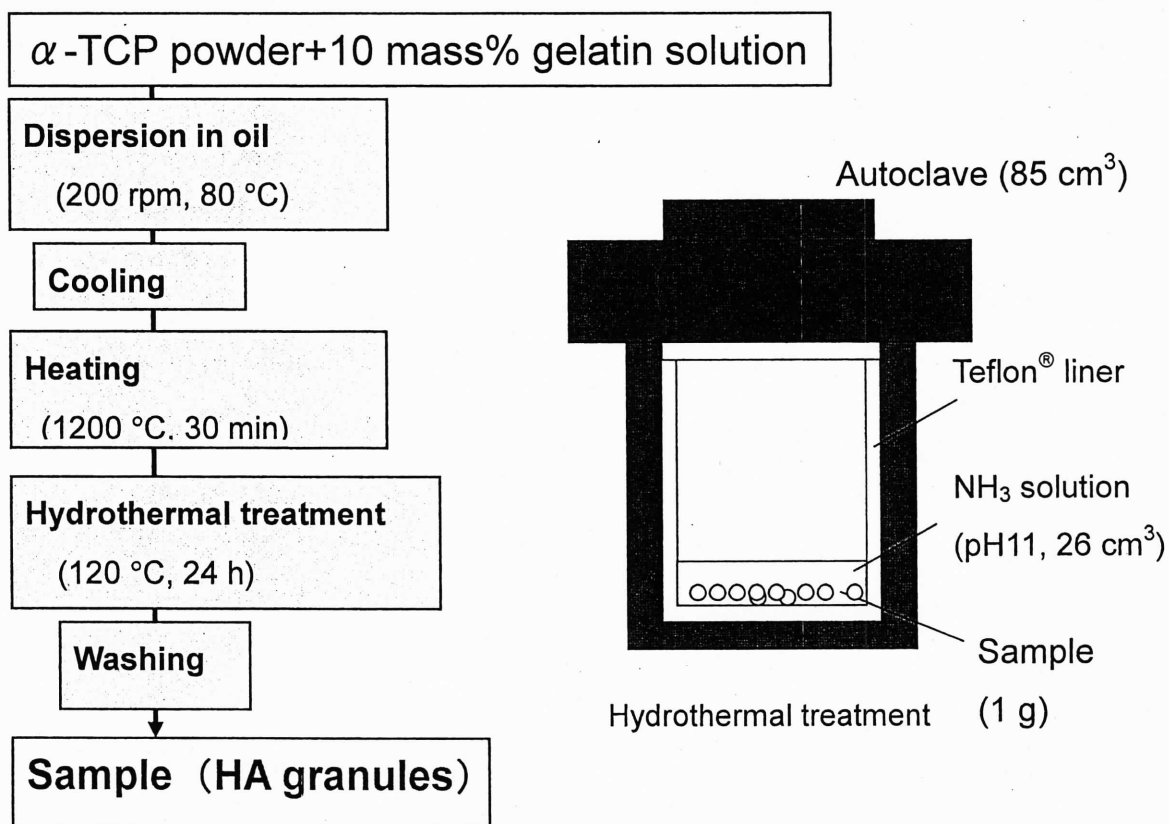


Fig. 5 - 4 Preparation procedure of spherical HA granules.

得られた顆粒の結晶相を X 線回折 ( XRD, RINT - 2200VL, Rigaku 株式会社 ) により, 形態を走査型電子顕微鏡 ( SEM, S - 4100 型電界放出型 SEM, 日立製作所株式会社 ) により調べた.

#### 5.2.2.2 テトラヒドロクルクミン吸着特性の評価

生体系に適用するため, 実験はすべて水系で行った. テトラヒドロクルクミンはメチルアルコール等の有機溶媒には任意に溶解するが, 水に対する溶解度は小さい. しかし, 本研究ではできるだけテトラヒドロクルクミンを HA に吸着させたいので浸漬溶液のテトラヒドロクルクミンの濃度も高いものが要求される. そこで始めに 25 °C におけるテトラヒドロクルクミンの水に対する飽和濃度を測定した. 溶液の濃度については, 溶液の吸収スペクトルを日本分光製の分光光度計 JASCO V - 650 Spectrophotometer において 光路長 10 mm, 光路幅 2 mm の石英セルを用いて測定し求めた. pH メーターは 2・2・1 に示したものと同一のものを用いて測定し, 25 °C で pH 4.01, 6.86, 9.18 の標準溶液を用いて校正した. 試料及びセル室は, ヤマト製恒温槽 Low Consatnt Water Bath BQ 100 を用いて 25 °C とした.

マイクロチューブに微量のテトラヒドロクルクミンを入れ, それがすべて溶解しないで残る量の水を加えて 72 h 放置した後, 上澄み液を採取し, 280 nm における紫外吸収スペクトルを測定した. 濃度については, あらかじめ作成しておいた検量線 ( Fig. 5 - 5 ) より求めた.



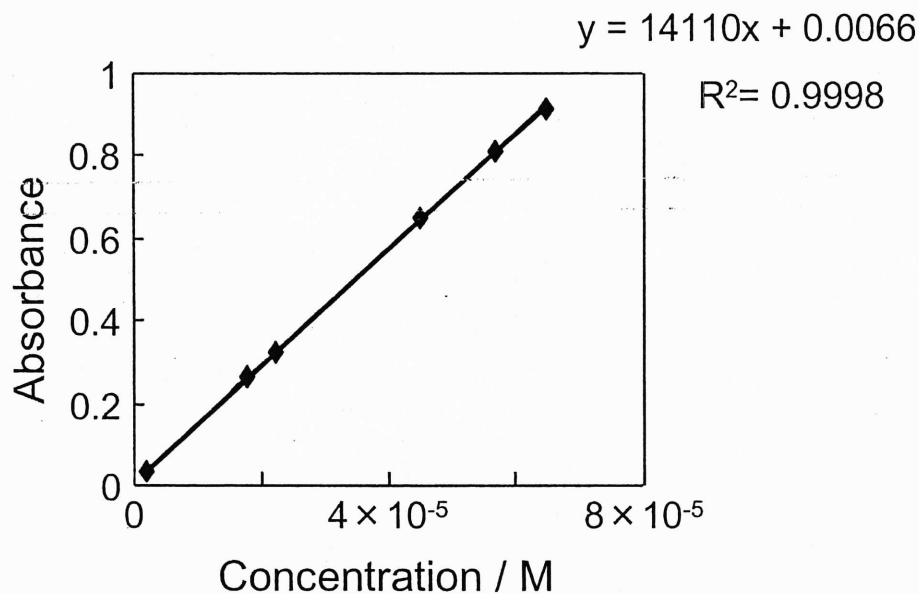


Fig. 5 - 5 Relationship of absorbance at 280 nm and concentration of tetrahydrocurcumin.

HA 顆粒 0.069 g を、ポリプロピレンチューブ中で飽和テトラヒドロクルクミン溶液 0.42 cm<sup>3</sup> に浸漬し、これを、室温で 144 h 静置した。実験数を 5 とした。ブランクとして、飽和テトラヒドロクルクミン溶液 0.42 cm<sup>3</sup> のみを入れたチューブも 5 本用意し、室温で 144 h 静置した。144 h 後、上澄みを液を 0.05 cm<sup>3</sup> とし、水で 1 cm<sup>3</sup> に薄め、吸光度を測定した。この際、スペクトルの形に変化がないことを確認するとともに、吸光度からテトラヒドロクルクミン濃度を求め、濃度減少から HA 顆粒に対するテトラヒドロクルクミンの吸着を調べた。

### 5.3 結果及び考察

#### 5.3.1 テトラヒドロクルクミンが細胞に与える影響の検討

骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 の培養 3 日後における 1 ウェルあたりの細胞数を Fig. 5 - 6 に示す。

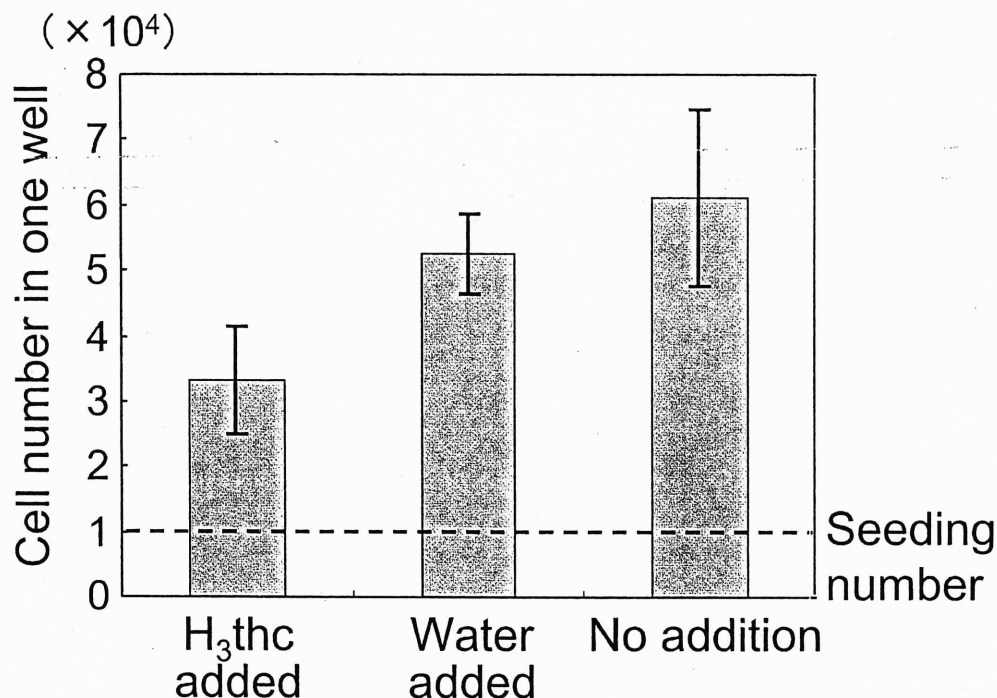


Fig. 5 -6 Number of osteoblast-like (MC3T3-E1) cell after culture for 3 d. (n=5)

最初にまいた細胞数が  $1 \times 10^4$  個/ウェルなので、いずれの培地でも細胞は増殖していた。しかしながら、テトラヒドロクルクミンを加えた培地中においては、細胞の増殖が抑制された。

Notoya<sup>12)</sup> らはクルクミンを使ってラットの骨芽細胞 (ROB cell) に対する影響を調べており、クルクミン濃度  $5 \times 10^{-6} \sim 5 \times 10^{-5}$  M の間で細胞増殖が著しく阻害されたと報告している。これはテトラヒドロクルクミンを加えた培地ではマウス骨芽細胞様細胞の増殖が抑制されるという本実験結果と一致するものである。また、Notoya<sup>12)</sup> らは、10 % FBS, 5 mM -  $\beta$  - glycerophosphate, 50  $\mu$ mg / ml アスコルビン酸を含有する培地  $\alpha$  - MEM で ROB セルを培養し、HA として細胞層に蓄積するカルシウムの量に対するクルクミンの影響も調べている。細胞が 3 日経過してコンフルエントに達した後、濃度  $1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-5}$  M の間でさまざまな濃度のクルクミンを加え、12 日間後のカルシウム量を測定したものである。その結果、クルクミンの濃度が高いほど水酸アパタイトの蓄積

量が無添加の場合にくらべて少なかったと報告している。更に, Notoya<sup>12)</sup> らはポリフェノールの 1 種であるケルセチンが培養骨芽細胞の増殖, 分化, 石灰化を抑制すると述べており, また, クルクミンが骨の代謝を抑制し, 骨芽細胞と破骨細胞両方の代謝のための防止剤であるかも知れないとも言及している。

これらの情報を考え合わせるとテトラヒドロクルクミンが生体内の骨代謝に関わってくる可能性はおおいにあると考えられる。

骨肉腫細胞 HOS の培養 3 日後における 1 ウェルあたりの細胞数を Fig. 5 - 7 に示す。

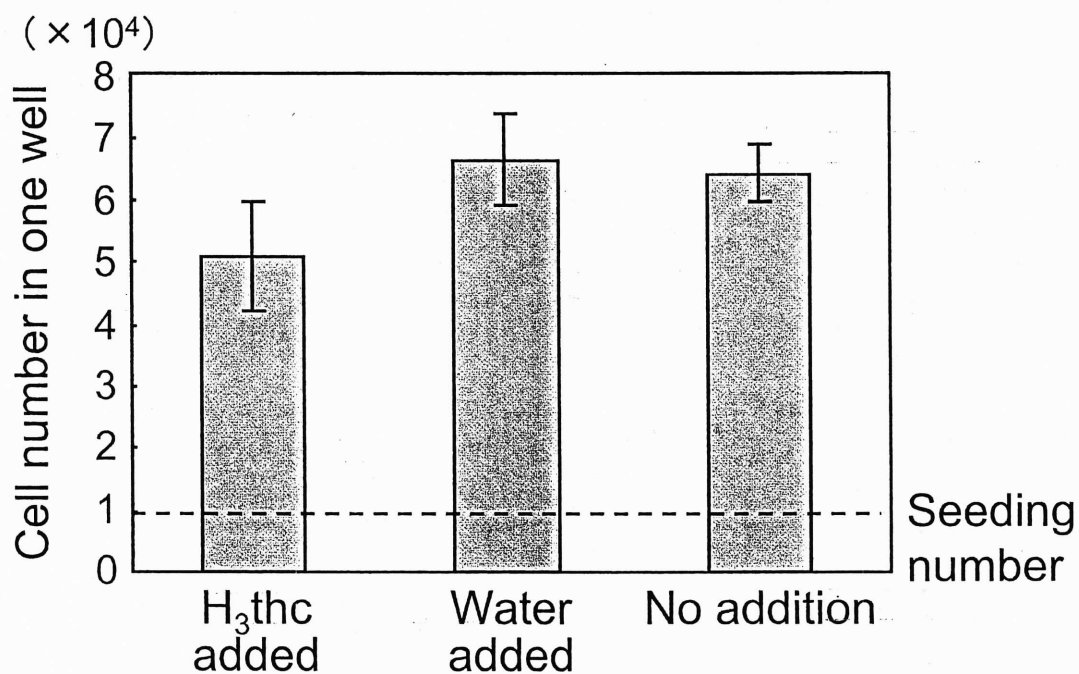


Fig. 5 - 7 Number of osteosarcoma (HOS) cell after culture for 3 d. (n=5)

骨芽細胞様細胞を培養した場合と同様に、テトラヒドロクルクミンを加えた培地中においては、細胞の増殖が抑制された。この結果は、テトラヒドロクルクミンが腫瘍抑制効果を示す可能性を示すものと考えられる。

### 5.3.2 HA 球状顆粒の作製とテトラヒドロクルクミン吸着特性の評価

Fig. 5-8 とFig. 5-9 に、得られた顆粒の XRD パターンと SEM 写真を示す。

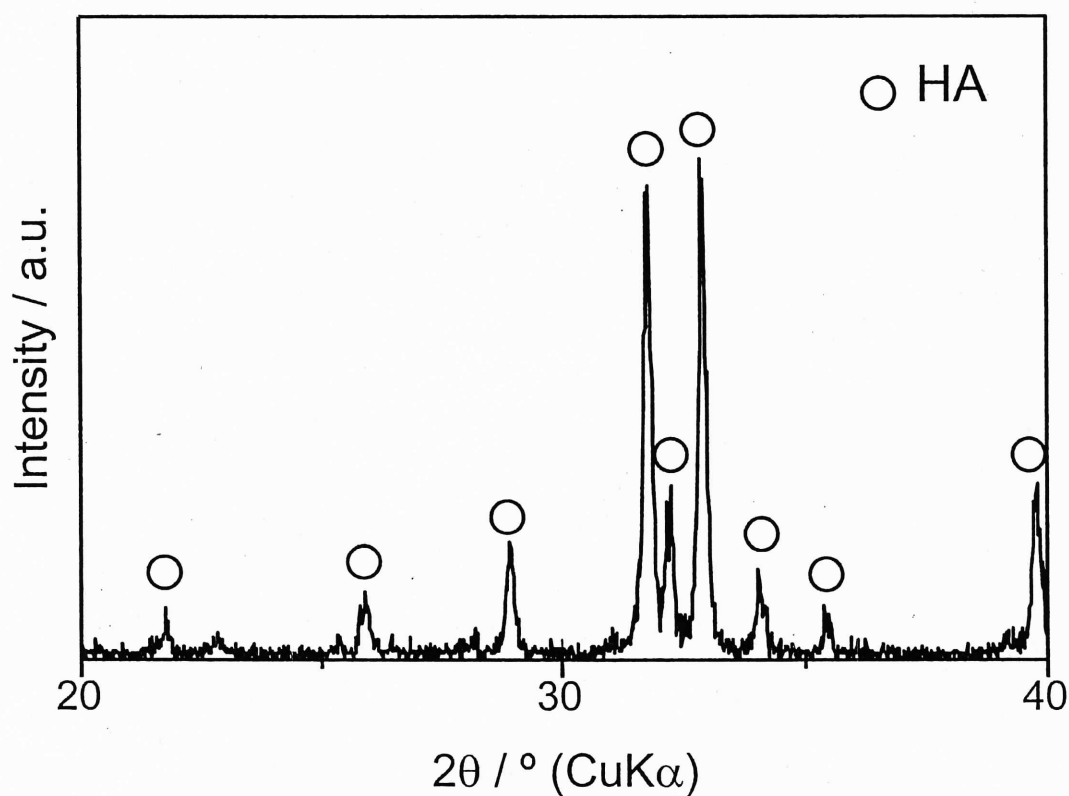


Fig. 5 - 8 XRD patterns of the granules after the hydrothermal treatment.

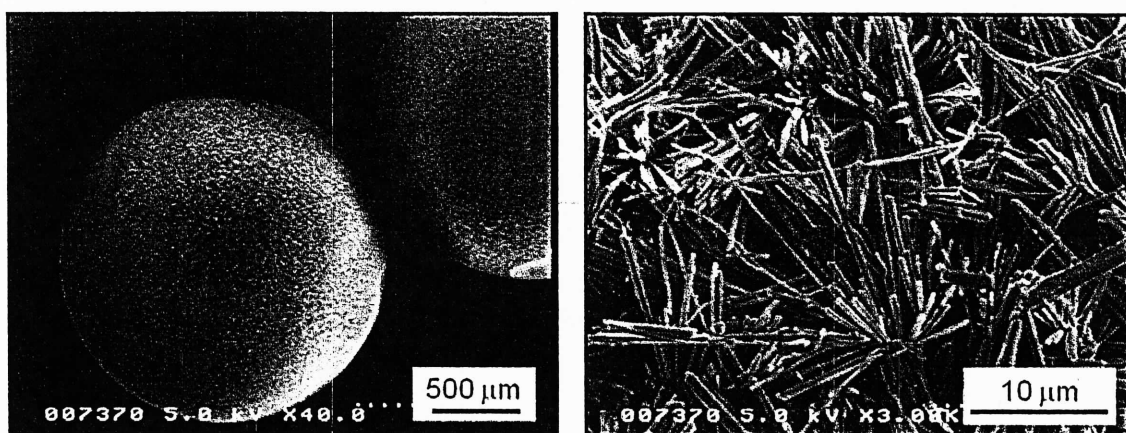


Fig. 5 - 9 SEM photographs of the granules after the hydrothermal treatment.

XRD パターンにおいて HA に帰属されるピークのみが見られ、得られた顆粒が HA 単相であることが分かった、形態を観察すると、柱状粒子からなる粒径 1 mm 程度の HA 球状顆粒が得られたことが分かった。

テトラヒドロクルクミンの飽和水溶液濃度は  $7.3 \times 10^{-5}$  M であった。吸着実験前後のテトラヒドロクルクミンの濃度変化を調べたところ、144 h 経過後には、濃度は初めの  $7.3 \times 10^{-5}$  M から  $3.5 \times 10^{-5}$  M に減少していた (Fig.5 - 10)。

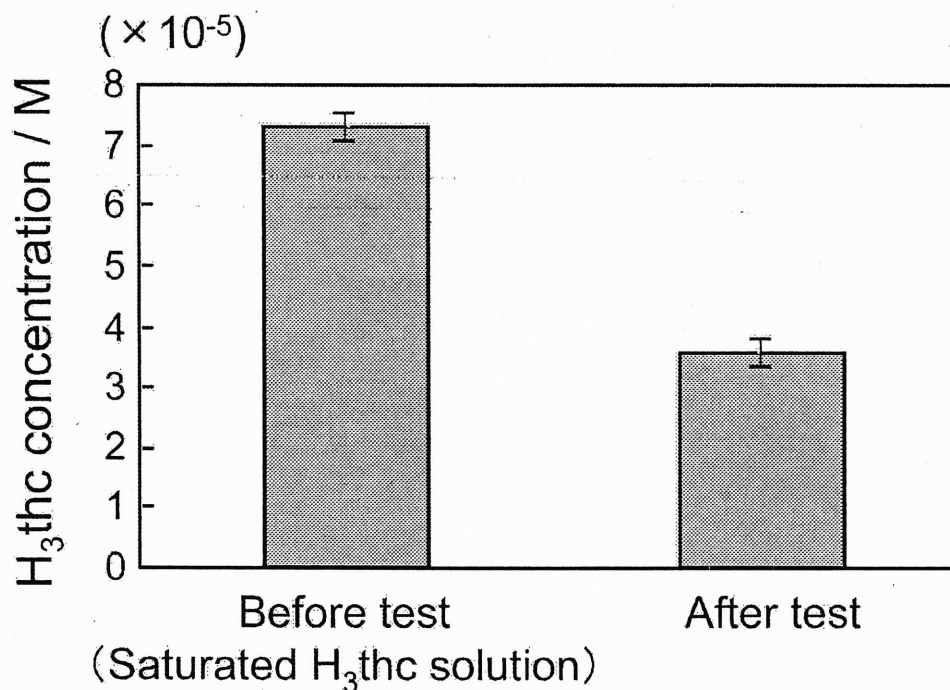


Fig.5 - 10 Concentrations of tetrahydrocurcumin before and after the adsorption test.  
(n = 5)

これは、HA 顆粒がテトラヒドロクルクミンを吸着したことを示す。この結果は、柱状粒子からなる HA 球状顆粒がテトラヒドロクルクミンの担体としての有用性を示すと考えられる。

#### 5.4 結 言

テトラヒドロクルクミンは、骨芽細胞様細胞および骨肉腫細胞に対して、増殖を抑制した。テトラヒドロクルクミンの骨部位での薬理効果の可能性が示された。テトラヒドロクルクミンはクルクミンに比べ長時間安定なのでクルクミンに比べ大きな効果が得られるものと考ええる。さらに、柱状粒子からなる水酸アパタイト顆粒は、テトラヒドロクルクミンを吸着した。これは、水酸アパタイト顆粒を担体として利用できる可能性を示すものである。

これらの結果より、テトラヒドロクルクミン/水酸アパタイト複合体の医療用新素材としての今後の展開と応用可能性は大いにありと期待される。

## 参 考 文 献 ( 5 章 )

- 1) T. Osawa, Y. Sugiyama, M. Inayoshi, S. Kawakishi: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1609 (1995).
- 2) (社)日本セラミックス協会編：“環境調和新材料シリーズ 生体材料” 初版, p.14 (2008), (日刊工業新聞社)
- 3) R. Z. LeGeros : *Clinical Orthopaedics and Related Reserch*, **375**, 81 - 98 (2002)
- 4) V. S. Komlev, S. M. Barinov, E. Girardin, S. Oscarsson, Å. Rosengren, F. Rustichelli, V. P. Orlovskii : *Sci. Technol. Adv. Mater.*, **4**, 503-508 (2003) .
- 5) T. Kawasaki, S. Takahasi, K. Ikeda : *Eur. J. Biocham.*, **152**, 361-371 (1985)
- 6) K. Ioku, M. Kamitakahara, N. Watanabe, O. Kawaguchi, S. Murakami, T. Ikeda : *Key Eng. Mater*, **361-363**, 645 - 648 (2009)
- 7) T. Takahashi, M. Kamitakahara, G. Kawachi, K. Ioku : *Key Eng. Mater*, **361-363**, 83 - 86 (2008)
- 8) K. Ioku, S. Yamauchi, H. Fujimori, S. Goto, N. Yashimura : *Solid State Ionics*, **151**, 147-150 (2002)
- 9) K. Ioku, G. Kawachi, S. Sasaki : *J. Mater. Sci.*, **41**, 1341-1344 (2006)
- 10) T. Takahashai, M. Kamitakahara, G. Kawachi, K. Ioku : *Key Engineering Materials* , **361-363**, 83-86 (2008)
- 11) T. Okuda, K. Ioku, I. Yonezawa, H. Migagi, Y. Gonda, G. Kawachi, M. Kamitakahara, Y. Shibata, H. Murayama, H. Kurosawa, T. Ikeda : *Biomaterials*, **29**, 2719-2728 (2008)
- 12) M. Notoya, H. Nishimura, J. T. Woo, K. Nagai, Y. Ishihara, H. Hagiwara : *European Journal of Pharmacology* , **534**, 55-66 (2006)

## 第 6 章 総合考察および総括

### 6.1 総合考察

本研究によりテトラヒドロクルクミンが機能性食品因子 (Functional Food Factor) として高度な生理生体調節機能を有し、また医療用キレート剤や医療用新素材への応用可能性がおおいに期待できることが裏づけられたと考える。

第 3 章で行ったサイクリックボルタンメトリーでは実験条件が pH 3 と pH 10 であった。生体体液の主な場所における pH とそこで作用する酵素の最適 pH は胃内 pH 2 (ペプシン), 口腔内 pH 7 (唾液アミラーゼ), 膵臓 pH 8 (トリプシン), 小腸 pH 約 5.5, 血液 pH 7.4, 細胞内 pH 7.0 である。故に, pH 10 という条件は一般的な生体では有り得ない強アルカリ環境である。この条件でテトラヒドロクルクミンの  $\Delta E_p$  (ピークセパレーション: 酸化ピークと還元ピークとの電位差) が増大し、電子の授受が遅くなることは、テトラヒドロクルクミンが生体の異常を感知した場合、自ら反応速度を抑える能力を有している可能性を示唆する。この観点から言えば、pH 10 でテトラヒドロクルクミンはクルクミンより大きな  $\Delta E_p$  を有し、クルクミンのように明確に  $\text{Fe}^{3+}$  を  $\text{Fe}^{2+}$  に還元しているといえなかった事実は、逆にテトラヒドロクルクミンの驚くべき特性を示すものといえる。

この第 3 章の実験はテトラヒドロクルクミンが生体内 pH 範囲では分子の構造を保持したままクルクミンに比べ小さい  $\Delta E_p$  を持ち、より可逆的に電子を授受しうる化合物であることの裏づけを与え、テトラヒドロクルクミンが生体内外で酸化還元剤として機能し、酸化還元触媒としても有用な能力を潜在的に持つことをあらわしていると考えられる。

第 4 章の O-フェナントロリン法では条件 pH 7.4 (血液の pH) で実験を行ったが、クルクミンは分解してしまい明確なデータを得られなかったのに比べ、テトラヒドロクルクミンは  $\text{Fe}^{3+}$  を  $\text{Fe}^{2+}$  に還元するという新事実を明らかにした。この第 3 章と第 4 章の実験事実は、テトラヒドロクルクミンは生体内で想定される pH 範囲 (酸性から中性近辺) ではクルクミンより高い  $\text{Fe}^{3+}$  と  $\text{Fe}^{2+}$  の捕捉能力と  $\text{Fe}^{3+}$  を  $\text{Fe}^{2+}$  に還元する能力を有するが、逆に高 pH では  $\text{Fe}^{3+}$  の還



元により生じる  $\text{Fe}^{2+}$  の発生を鈍らせていることを示すものである。これはあたかもまるでテトラヒドロクルクミン自身が周囲の状況を判断し、その生体の最も望ましい恒常状態を保つ方向に働いているように見える。

第5章ではテトラヒドロクルクミンの骨芽細胞様細胞と骨肉種細胞の培養実験を行った。この2種類の細胞試験ではテトラヒドロクルクミンを添加した場合、しない場合に比べていずれも細胞の増殖を抑制した。しかし、クルクミンには *in vitro* では中性付近で速やかに分解するが、より *in vivo* に近い条件と考えられる血清中ではその分解速度は遅くなるという報告がある<sup>1)</sup>。この報告を考慮すると、上記の細胞実験でもクルクミン同様、テトラヒドロクルクミンも *in vitro* と *in vivo* の場合とでは異なった結果をもたらすものと考えられる。

本実験では主として pH 変化による実験を行ったが、血清等を使用したより生体条件に近いものでテストを行えば、予想しなかった効果を引き出せる可能性があるかと推察される。

骨代謝に関しては、卵巣摘出したマウス（骨にカルシウム蓄積作用をもつエストロゲンの欠如したマウス）の実験でクルクミンの投与により骨の再吸収（破骨）が抑制されたという報告がある。同じ報告中で著者はクルクミンは破骨と造骨の両方の機能を持つかもしれないとも記述している<sup>2)</sup>。

女性は加齢により卵巣が衰え、卵巣ホルモンが不足し、骨粗鬆症を起こしやすくなる。ホルモンのバランスが崩れるとエストロゲン不足により破骨細胞が働き過ぎ、必要以上に破骨と再吸収が行われ、骨の形成、代謝システムに不都合が生じる。もし、クルクミンが骨の代謝システム（造骨と破骨）を制御する能力を有する可能性がある<sup>2)</sup> とすればテトラヒドロクルクミンは更に強力な骨代謝システム制御力を秘めていると考えられ、有力な骨折や骨粗鬆症などの骨疾患の修復剤となりうる。

また、生体内で重要な役割を果たしているのはクルクミンではなく、投与後、還元されたクルクミンではないかという説がある。実際に培養細胞を用いて代謝生成物の検討によりクルクミンからテトラヒドロクルクミンへの変換、さらにフェルラ酸への変換も報告されている<sup>3)</sup>。生じたフェルラ酸自体も無害であり、活性酸素種などのラジカルと反応する抗酸化活性を有しており、認知症の

改善，予防にも効果があることも知られている。

更に，鉄 - ニトリロ三酢酸 (NTA) 錯体をマウスの腹腔内に注射することにより腎臓ガンが誘発され，その原因と考えられるフリーラジカルの発生も疾患部で確認されており，その酸化障害の防御にテトラヒドロクルクミンがクルクミンより強力な防御効果を示したことが実験的に証明されている。

本研究での実験結果やこれまでのたくさんの様々な角度からアプローチした報告を考え合わせると，抗酸化活性というのはひとつの反応だけではなく，複数の機能，効果が重なり，よりその効果を高め，発現しているのではないかと考えられる。

クルクミンが経験的に体に良い成分，機能性物質，抗酸化物質と考えられている理由はクルクミン自体の化学変化によるものに加え， $\text{Fe}^{3+}$  から  $\text{Fe}^{2+}$  への変化のような還元作用，フリーラジカル（ガン発症要因のひとつ）生成の原因となる過剰な鉄の除去作用（鉄濃度調整機能），フェルラ酸のように分解生成物自体も生理活性を持つ，などの機能や条件が複合的に作用し，結果として酸化剤にも還元剤にもなり，生体の恒常性を強力に保つからであると推測される。その意味ではテトラヒドロクルクミンはクルクミンより安定で扱いやすく，かつその機能をパワーアップしたある種の万能生体内バッファー成分といえるかもしれない。

本研究の各章でも再三確認されているが，テトラヒドロクルクミンの pH に異存せず，空気酸化にも安定な性質はクルクミンと比較するとやはり非常に大きなメリットと言える。

最近，テトラヒドロクルクミンの持つ生理機能にもかなり関心が持たれるようになり，従来知られている薬効に加え，認知症の予防と改善，解毒酵素誘導作用，糖尿病や動脈硬化抑制作用，糖尿病の合併症として酸化ストレスにより発症するといわれている腎障害，白内障などにも効果があることがわかり，これらの疾患の予防物質として期待されている。

このような例をみるとテトラヒドロクルクミンは，ほとんどの疾患に有効な魔法のような機能を持つ多方面での応用可能な物質と思われる。また，テトラヒドロクルクミン自身が周囲の状況を判断し，その生体の最も望ましい恒常状態を保つ方向に働く物質とすれば，罹病予防や疾患治療においては夢のような

万能の物質であり、はかり知れない潜在能力を秘めている可能性がある。

テトラヒドロクルクミンのこの特性をドラッグデリバリーシステムに応用した場合、水酸アパタイト粒子に担持させたテトラヒドロクルクミンが疾患部で骨芽細胞を刺激する等の適切な生理活性能を発揮した後、テトラヒドロクルクミンをすべて徐放した水酸アパタイトがさらに骨再生を促進し、最終的に水酸アパタイト自身の持つ骨再生力の大きな増強をもたらすと考えられる。それゆえ、この骨再生分野においても今後の期待には大きいものがある。

テトラヒドロクルクミンが多機能を有する理由のひとつにその分子構造が挙げられる。天然の抗酸化剤として知られているビタミン E ( $\alpha$ -トコフェロール) はフェノール構造を持っており、ラジカル除去のとき機能するのはこのフェノール部分であると報告されている。テトラヒドロクルクミンの場合もラジカルに作用するのはこの部分だと考えられる。テトラヒドロクルクミンは分子内にこのフェノール構造のほかに金属とキレート結合をする  $\beta$ -ジケトン部分を持っている。そのためテトラヒドロクルクミンはラジカル捕捉能の他に鉄調整機能も備えていると考えられ、抗酸化作用があると考えられているが  $\beta$ -ジケトン構造を持たないビタミン E や他のポリフェノール類と比較するとかなり複雑な挙動をすることは想像に難くない。

またクルクミノイドは一般的に抗菌作用を有することが知られており、理由のひとつにその増殖に多量の鉄を要する菌や病原体がクルクミノイド添加により鉄濃度が低下し増殖を抑制されるためではないかということが挙げられている。この抗菌作用も  $\beta$ -ジケトン部分に鉄キレートが生成することによって起因される除鉄効果によるものと考えられる。

抗酸化剤には水溶性と脂溶性のものがある。ビタミン C などの水溶性の抗酸化剤は水相にあるラジカルを速やかに捕捉することはできるが、細胞膜の内部などの脂質相にあるラジカルを捕捉することができない。一方、現在天然の最強酸化防止剤といわれているビタミン E は脂溶性であり、細胞膜の内部などの脂質層に存在し、生体膜の損傷を防いでいる。ビタミン E のフェノール部位が 1 つであるのに対し、テトラヒドロクルクミンはフェノール部位を 2 つ所有し、かつ  $\beta$ -ジケトンも有している。さらに脂溶性であるものの水にもわずかに溶解し、天然物由来である。このことはテトラヒドロクルクミンがビタミン E 以上

の強力な複雑な抗酸化能力を発揮する安全な物質であることは想像に難くない。

これまでにクルクミンの抗酸化機能解明のために数え切れないほどの報告が出されているが決定的なものは見当たらない。このことは、その優れた生体生理調節機能を持つゆえにあまりに多方面で様々な側面と機能を呈する為だと思われる。状況によって酸化剤にもなり、還元剤にもなり、また、酸化還元のみでは説明しきれない効果も示す。クルクミノイドを抗酸化剤物質と限定するよりは、むしろオールマイティな生体生理調節機能物質と呼ぶ方がふさわしいかも知れない。そのなかでもテトラヒドロクルクミンが最強物質と思われる。

すでに酸化防止剤、抗菌剤として古くから使用されているクルクミンは黄色に着色しており用途が限定される。また、アルコール等の溶媒に対する溶解度は低い。しかし、テトラヒドロクルクミンの場合は無色で、長時間安定であり、クルクミンが溶解しにくい溶媒に対する溶解度も高い（アルコールに対してはほとんど任意に溶解する）。テトラヒドロクルクミンのこれらの特性に注目すればこれまで挙げた他にも様々な用途が考えられ、ビタミンEのように食品、化粧品、医薬品等の酸化防止剤としての利用など、クルクミン以上にその応用範囲は広がると考えられる。

以上のことを集約すると、人間の体に対してクルクミン以上の生体生理調節機能を持つテトラヒドロクルクミンは、水酸アパタイトとの複合体としての活用は言うに及ばず、テトラヒドロクルクミン単独でも食の保全、安全面、医療面で我々の健康と生活に多大な貢献ができる可能性を持つ素材と考えられる。

## 6.2 総括

クルクミンの還元体であるテトラヒドロクルクミンは、クルクミンに比べ抗酸化活性が高いと報告されている。本研究ではその生理活性能力に注目して水溶液中における基礎的物性を明らかにした。さらに、優れた生体親和性を持つ水酸アパタイトとの複合体を創製し、ドラッグデリバリーシステムへの応用を視野に入れ、医療用の薬剤及び新素材開発を目指して検討を行ったものである。

各章についての内容を要約すると次のようになる。

第1章では本研究の目的と既往の研究を含めた背景、研究を実施するための

方針と内容の概要を述べた。

第2章ではテトラヒドロクルクミンの機能解明を目的とし、同じく生理活性機能を持つクルクミンと比較検討しながら水溶液中における安定性と酸解離性を初めて明らかにした。クルクミンは pH 3.0 - 10.0 の水溶液中で空気酸化を受け 1 時間以内に分解した。特に pH 8.0 では速やかに分解した (半減期 1.0 min)。一方テトラヒドロクルクミンは 2 時間の間分解せず、空気酸化に対する高い安定性が示された。吸光光度滴定によりテトラヒドロクルクミンの酸解離定数を算出したところ  $pK_{a1} = 8.59 \pm 0.06$ ,  $pK_{a2} = 9.53 \pm 0.01$ ,  $pK_{a3} = 10.74 \pm 0.02$  となり、比較のため求めたクルクミンの酸解離定数 ( $pK_{a1} = 8.47 \pm 0.032$ ,  $pK_{a2} = 9.43 \pm 0.025$ ,  $pK_{a3} = 10.59 \pm 0.03$ ) より各々 0.1 程度大きい値となった。これはテトラヒドロクルクミンの方がクルクミンより酸性度が低いということを意味する。

第3章では第2章で求めた酸解離定数をもとにクルクミン、テトラヒドロクルクミンの鉄 (II, III) 錯体の安定度定数を求めるとともに、電気化学的挙動検討の為、サイクリックボルタンメトリーを測定した。その結果、安定度定数テトラヒドロクルクミンの方が若干大きな値を与えた。CV ではテトラヒドロクルクミンの方がクルクミンより低い酸化還元電位を与えるという新しい事実を見出した。これはテトラヒドロクルクミンの方がクルクミンより酸化されやすい(相手を還元し易い)ことを示唆するものである。また、現在、副作用が認められつつも医療用鉄キレート試薬として使われているデフェロキサミン、デフェラシロクス-鉄錯体の安定度定数とテトラヒドロクルクミンのそれとを比較すると十分機能する値だと考えられる。

第4章ではテトラヒドロクルクミンの pH 7.4 におけるテトラヒドロクルクミンの鉄(III) ~ 鉄(II) への還元能力を、*O*-フェナントロリン・鉄 (II) 錯体の生成量より測定し、生成速度定数  $k_{obs}$  を今回の実験で始めて求めることが出来た。 $k_{obs}$  は原点を通る直線であり、生成した錯体の量はテトラヒドロクルクミンの濃度に依存することがわかり、テトラヒドロクルクミンが鉄(III) ~ 鉄(II) への還元能力を持つことが明らかになった。

第5章ではテトラヒドロクルクミンが骨芽細胞、骨肉腫細胞に与える影響を明らかにした。さらに、テトラヒドロクルクミン/水酸アパタイト複合体を創製

し、その特性を利用した分野への応用可能性が十分あることを確認した。

第6章では、各章の研究内容を要約して総括とした。

#### 参 考 文 献 ( 第 6 章 )

- 1) Y. - J. Wang, M. - H. Pan, A. - L. Cheng, L. - I. Lin, Y. - S. Ho, C. - Y. Hsieh, J. - K. Lin : *J. Pham. Biomed. Anal.*, 15, 1867 (1997)
- 2) M. Notoya, H. Nishimura, J. T. Woo, K. Nagai, Y. Ishihara, H. Hagiwara : *European Journal of Pharmacology*, 534, 55 (2006)
- 3) シーエムシー出版編集発行 : 植物ポリフェノール含有素材の開発・その機能性と安全性・ p. 216

## 謝 辞

本研究は東北大学環境科学研究科教授星野 仁先生，並びに教授井奥 洪二先生のご指導のもとに行いました。ここに厚く御礼申し上げます。井奥先生には途中から著者を受け入れていただき，暖かいご配慮とご指導を受け，くじけそうな自分に対して本研究を遂行する上で大きな励ましとなりました。東北大学環境科学研究科准教授壹岐伸彦先生には本務でさえ多忙な身であるにも関わらず，著者のために長期に渡り忍耐強く初歩からのきめ細やかなご指導を賜り感謝にたえません。東北大学環境科学研究科助教上高原理暢先生には遠路，筆者の勤務地である一関高専にまで足を運んでいただき，著者の実験環境を考慮しながらの懇切丁寧なご指導を賜りました。心より感謝申し上げます。

東北大学環境科学研究科教授石田秀輝先生には貴重なコメントとご指導を頂戴致しました。厚く御礼申し上げます。

一関高専名誉教授佐野茂先生には東北大学環境科学研究科編入学から始まり，実験設備，試薬調達，実験器具の作製，実験上の指導と助言を含む並々ならぬご支援をいただきました。心から感謝申し上げます。

東北大学多元物質科学研究所（多元研）所長齋藤文良先生には入学時より著者の進捗状況を気にかけていただき卒業に向けて多大なるご配慮をいただき感謝に耐えません。

岩手県南技術研究センター所長小田嶋次勝先生（一関高専名誉教授）には貴重なご指導とご助言をいただき，感謝申し上げます。

一関高専校長丹野浩一先生を始め，一関高専の教職員の皆様にも多くのお気遣いにご協力をいただきました。御礼申し上げます。

このように多くの方々のご指導，ご協力，ご援助によりこの研究に一区切りをつけることができましたことをここに記して改めて心から感謝申し上げる次第です。ありがとうございました。

学術論文,

- (1) 水溶液中におけるテトラヒドロクルクミンの酸化安定性と酸解離特性の評価  
佐藤きよ子, 壹岐伸彦, 高橋 透, 星野 仁: 分析化学 (Bunseki Kagaku),  
57, 257, (2008).
- (2) ターメリック (うこん) よりクルクミン類単離の教材化  
佐藤きよ子: 日本化学会「化学と教育」, 49, 738, (2001).
- (3) 鶏卵よりコレステロール抽出の教材化  
佐藤きよ子: 日本化学会「化学と教育」, 48, 614, (2000).
- (4) 硫酸銅を用いた化学実験の基本操作指導  
佐藤きよ子: 日本化学会「化学と教育」, 48, 400, (2000).
- (5) WWW における化学教育リソース  
佐藤きよ子: 日本化学会「化学と教育」, 44, 735, (1996).
- (6) Sesquiterpene Lactones from *Carpesium Abrotanoides*  
M. Maruyama, A. Karube, K. Sato: Phytochemistry, 22, 2773, (1983).

研究紀要

- (1) Isolation and identification of several compounds from *Lamiun purpureum*-Part 2  
K. Sato: 一関高専紀要, 39, 19, (2004).
- (2) Isolation and identification of several compounds from *Lamiun purpureum*-Part 1  
K. Sato: 一関高専紀要, 38, 25, (2003)
- (3) Constituents of *Solidago altissima* K. Sato: 一関高専紀要, 37, 27, (2002)
- (4) Isolation and identification of several compounds from *Lactuca indica* Var. *laciniata* (2)  
K. Sato: 一関高専紀要, 36, 35, (2001)
- (5) Isolation and identification of several compounds from *Lactuca indica* Var. *laciniata*  
K. Sato: 一関高専紀要, 35, 75, (2000)
- (6) Constituents of *Carpesium cernum* L.  
K. Sato: 一関高専紀要, 33, 97, (1998)
- (7) Constituents of the Bark of *Salix* species (4)  
K. Sato: 一関高専紀要, 32, 49, (1997)



- (8) Constituents of the Bark of Salix species (3)  
K. Sato: 一関高専紀要, 30, (1995)
- (9) Isolation and Identification of a Chatechin from Salix Integra  
K. Sato: 一関高専紀要, 28, (1993)
- (10) Constituents of the Bark of Salix bakko, Kimura  
K. Sato: 一関高専紀要, 27, (1992)
- (11) 「植物より天然物単離の教材化の研究」…茶葉からカフェインの単離…  
 丸山雅雄, 佐藤きよ子: 宮城教育大学紀要 (1990)
- (12) フラバノン類の赤外線吸収スペクトル  
 細川静男, 佐藤きよ子: 一関高専紀要 (1976)
- (13) ハハコグサの花に含まれる全フラボノイド成分について  
 細川静男, 内山博子, 佐藤きよ子: 一関高専紀要 (1975)

#### 学会発表

- (1) Xanthium strumarium の成分について  
佐藤きよ子: 平成 21 年度化学系学協会東北大会, (2009) 9 月 日大工学部
- (2) Cayenne Pepper の成分について  
佐藤きよ子: 平成 20 年度化学系学協会東北大会, (2008) 10 月  
 八戸工業大学
- (3) Lactuca raddeana var. elata の成分について  
佐藤きよ子: 平成 19 年度化学系学協会東北大会, (2007) 9 月 山形大学
- (4) 水溶液中におけるクルクミノイドの pKa の決定  
佐藤きよ子: 平成 18 年度化学系学協会東北大会, (2006) 9 月 秋田大学
- (5) Turmeric の含有成分について  
 佐々木 雅, 佐藤きよ子 第 8 回化学工学会学生発表会, (2006) 3 月 一関
- (6) Xanthium Italicum Moretti の含有成分について  
佐藤きよ子 平成 17 年度 化学系学協会東北地方大会, (2005) 9 月 仙台
- (7) Lamium purpureum の含有成分について  
佐藤きよ子 平成 16 年度 化学系学協会東北地方大会, (2004) 9 月 盛岡
- (8) Ssllix bakko の含有成分について

- 佐藤きよ子 化学系 9 学協会連合東北地方大会, (2003) 10 月 福島
- (9) パプリカの含有成分について  
佐藤拓実、新山学、横川圭、佐藤きよ子 第 4 回化学工学会学生発表会,  
(2002) 3 月 鶴岡
- (10) Paprica の含有成分について  
佐藤きよ子 化学系 7 学協会連合東北地方大会, (2001) 9 月 盛岡
- (11) constituents of *Xanthium italicum*  
K. Sato : World Chemistry Congress 2001 (2001), 7 月,  
オーストラリア ブリスベン
- (12) Constituents of *Solidago altissima*  
K. Sato : Pacifichem 2000 (2000), 12 月, ハワイ ホノルル
- (13) Cayenne Pepper の含有成分について  
石川慶浩, 高橋まり, 佐藤きよ子 : 第 2 回化学工学会学生発表会, (2000)  
3 月 仙台
- (14) *Lactuca indica* var. *laciniata* の含有成分について  
佐藤きよ子 : 化学系 7 学協会連合東北地方大会, (1999) 石巻
- (15) *Xanthium strumarium* の含有成分について  
佐藤きよ子 : 化学系 7 学協会連合東北地方大会, (1998) いわき
- (16) *Salix integra* Thumb. の成分について  
佐藤きよ子 : 日本化学会・東北地区大会 (1997) 盛岡
- (17) 茶葉からカフェインの単離……授業時間中に再結晶まで……  
佐藤きよ子 : 東北地区化学教育研究協議会 (1990)